

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

ALD-kaetud nanoosakeste ning räniplaatide mõju inimese fibroblastidele

Bakalaureusetöö

Geenitehnoloogia (12 EAP)

Rait Vetik

Juhendajad:

PhD Mariliis Klaas

PhD, MD Viljar Jaks

TARTU 2017

INFOLEHT

ALD-kaetud nanoosakeste ning räniplaatide mõju inimese fibroblastidele

Kuna nanomaterjalid pakuvad võimalust uute meditsiiniliste rakenduste jaoks, on tähtis võimalikke kõrvalmõjusid kontrollida. Antud töös on vaadeldud aatomkihtsadestamisega kaetud raua nanopartiklite ja räniplaatide mõju inimese fibroblastidele. Teostatud on koekultuuri katsed, rakkude arvukuse mõõtmine ja immunofluorestsentsvärvimine. Võrreldud on erinevate nanokilede mõju rakkude proliferatsioonile ja apoptoosile.

CERCS: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Märksõnad: fibroblastid, aatomkihtsadestamine, nanomaterjalid

The effect of ALD-covered iron nanoparticles and silicium discs on human fibroblasts

Because nanomaterials offer the possibility of new potential medical applications it becomes important to determine possible sideeffects. In this thesis the effect of ALD-covered iron nanoparticles and silicium discs on human fibroblasts is observed. Cell culture experiments, cell population density measurements and immunofluorescent staining is done. The effects of various ALD layers on cell growth, proliferation and apoptosis is observed.

CERCS: Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

Keywords: fibroblasts, ALD, nanomaterials

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Nanomaailm	6
1.2 Nanoosakeste süntees	7
1.3 ALD meetod	9
1.4 Nanotoksikoloogia	11
1.5 Fibroblastid	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1 Töö eesmärk	15
2.2 Materjalid ja metoodika	15
2.2.1 Nanoosakesed, ALD materjalid ning fibroblastid	15
2.2.2 Raua nanopartiklid	17
2.2.2.1 Rakkude arvukuse mõõtmine	17
2.2.2.2 Immunofluorestsentsmikroskoopia	20
2.2.3 Si plaadid	21
2.3 Tulemused	22
2.3.1 Nanoosakeste pärssiv mõju fibroblastide kasvule	22
2.3.2 Nanoosakeste mõju rakkude proliferatsioonile ja apoptoosile	23
2.3.3 Nanokilega räniplaatide mõju rakkude proliferatsioonile ja apoptoosile	25
2.4 Arutelu	28
KOKKUVÕTE	30
SUMMARY	31
TÄNUSÕNAD	33
KASUTATUD KIRJANDUS	34
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	39
LIHTLITSENTS	41

KASUTATUD LÜHENDID

ALD	– <i>atomic layer deposition</i> , aatomkihtsadestamine
DMSO	– <i>Dimethyl sulfoxide</i> , dimetüülsulfoksiid
EM	– <i>extracellular matrix</i> , ekstratsellulaarne maatriks
EMT	– <i>epithelial-mesenchymal transition</i> , epiteliaal-mesenhümaalne transitsioon
ER	– <i>endoplasmic reticulum</i> , endoplasmaatiline retiikulum
FBS	– <i>fetal bovine serum</i> , veiseseerum
MET	– <i>mesenchymal-epithelial transition</i> , mesenhümaalne-epiteliaalne transition
OLED	– <i>organic light-emitting diode</i> , orgaaniline valgusdiod
PBS	– <i>phosphate-buffered saline</i> , fosfaatpuhverdatud füsioloogiline soolalahus
TBS	– <i>TRIS-buffered saline</i> , TRIS-puhverdatud soolalahus
TFEL	– <i>Thin-film electroluminescent</i> , õhukese kihi elektroluminestsents

SISSEJUHATUS

Nanomaterjalid omavad igapäevaelus aina suuremat rolli. Alates elektroonikast kuni meditsiinini välja võib meie ümber leida nanotasemel töödeldud materjale. Samuti viiakse üha enam tähelepanu inimtegevuse läbi tekkinud potentsiaalselt ohtlikele nanomaterjalidele, nagu seda on heitgaasides leiduvad fullereenid. Seetõttu on oluline nanomaterjalide ohutuse ja mõju kindlakstegemine enne selle kasutuselevõttu. Antud töös on käsitletud nii nanopartiklite kui nanokilede mõju inimese rakkudele. Töö on valminud koostöös Tartu Ülikooli Füüsika Instituudi materjaliteaduse vanemteaduri Dr. Aile Tamme tööruhaga.

Töös on vaadatud nanomaterjalide ning aatomkihtsadestamise tausta ning inimese fibroblaste. Katsed jaotuvad kaheks – raua nanopartiklite ja räniplaatidega sooritatud katsed. Uuritakse rakkude elutegevust vaadeldes rakkude arvu, proliferatsiooni ja apoptoosi. Teostatud on florestsentsvärvimised DAPI, Ki-67, Falloidiini ja TUNEL kit-iga. Vaadeldakse erinevate katetega ainete mõju ja võrreldakse tulemusi.

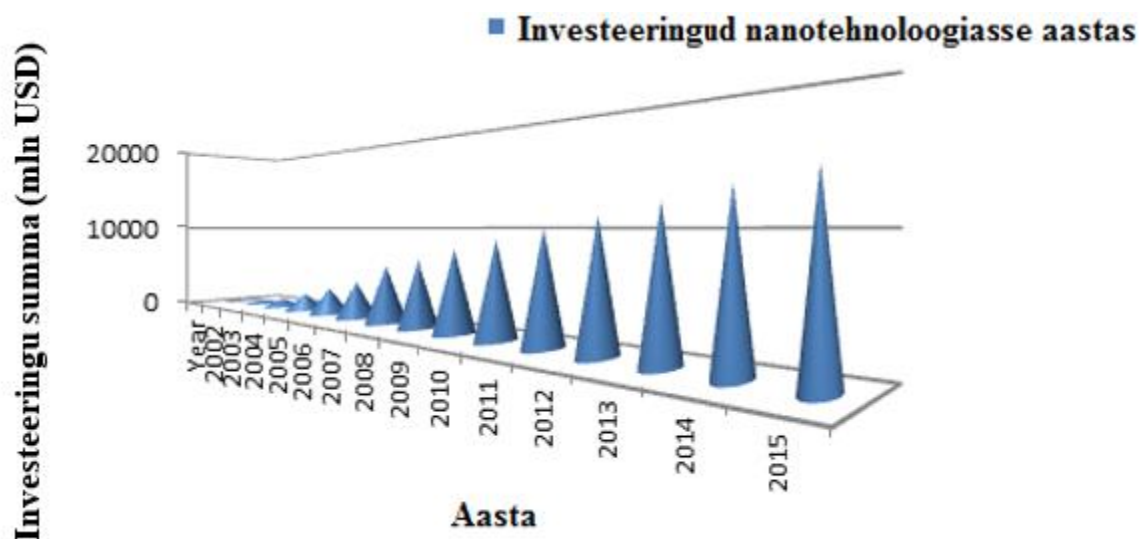
Töö eksperimentaalses osas viiakse läbi katsed, et tuvastada, kas ainete katmine antud metalloksiid kihtidega vähendab ainete kahjulikku mõju inimese rakkudele. Tuleviku eesmärk on võimaldada nanoosakeeste katmise läbi osakesi inimkehas turvaliselt kasutada. See võimaldaks erinevate materjalide kasutamist inimkehas. See võib väljenduda insuliini mõõtvast kiibina naha all või vähirakkudega seonduva nanopartiklina.

Käesoleva töö eesmärk on kirjeldada aatomkihtsadestamisega toodetud metalloksiidsete katetega raua nanopartiklite ning räni plaatide mõju inimese fibroblastidele, kirjeldades rakkude kasvu ja elutegevust.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Nanomaailm

Nanomaailma mõiste võttis esmalt kasutusele Tokyo Ülikooli professor Norio Taniguchi aastal 1974 [1]. Vaatamata asjaolule, et nanomaailma idee oli populaarsust kogumas juba aastaid, polnud võimalik seda vaadelda enne skanneeriva tunnelmikroskoobi leiutamist 1981. aastal. [2] 1986. aastal anti leiutajatele töö eest ka Nobeli preemia. [3] Nanotasandi uurimine on sealt alates olnud tõusuteel nii investeeringusummade kui avaldatud artiklite arvu poolest. [4] Asjaolu, et materjalid omavad nanotasandil makrotasandist tihti täiesti erinevaid tunnuseid, on põhjuseks miks nanotasandist on saanud sedavõrd atraktiivne uurimisobjekt (Joonis 1.).



Joonis 1. Avaliku sektori investeeringud uurimistöösse aastatel 2002-2015. Modifitseeritud. [5]

Toetudes joonisel 1. välja toodud statistikale, saab väita, et üha enam panustatakse ressursse, et uurida nanotasandi eripära ja iseärasusi. Sellest järjepidevast tööst on tänapäeval saadud tuntud OLED (*organic light-emitting diode*) lahendused televiisoritel ja arvutitel. [6] Samuti on märkimisväärne USA mereväe nanokeraamika kasutuselevõtt oma laevadel. [7] Kattes kliimakontroll-seadmete liikuvad osad nanokeraamikaga säästis merevägi 10 aasta jooksul ligi 20 miljonit dollarit parandustööde arvelt, mida oleks muidu pidanud tihedamini läbi viima [8]. Lisaks eeltoodud näidetele on nanotasandil ainete manipuleerimine perspektiivikas ka

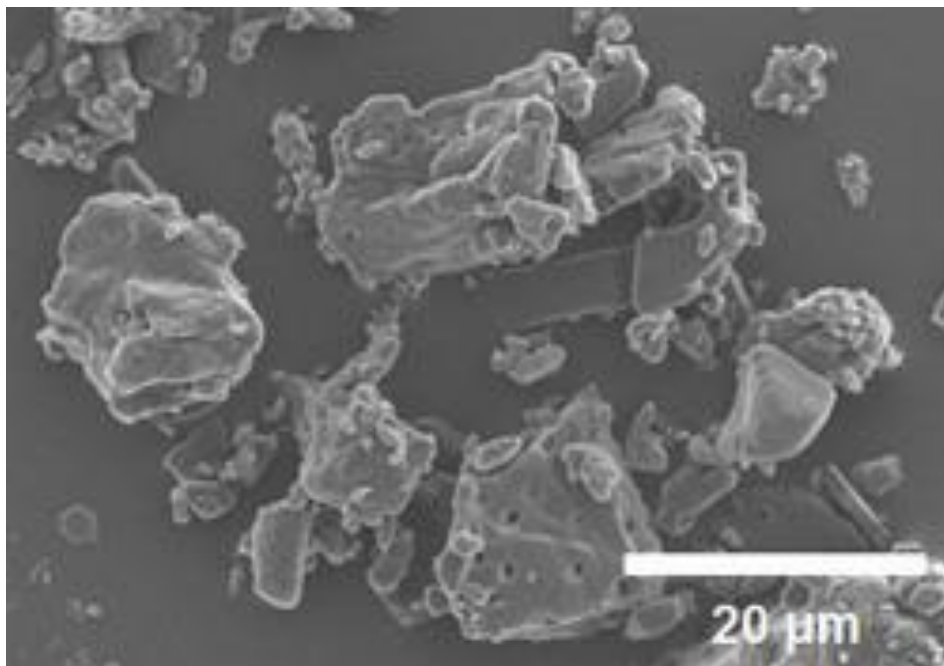
meditsiinis, ehituses, toidutööstuses ja muudes valdkondades. [9] Piiravaks faktoriks on hetkel meie teadmised mehhanismidest, mis suurusastme 1-100 nm vahel töötavad [10]. Samas tuleb aga meeles pidada, et kuigi looduses leidub nanoosakesi, mis on sinna sattunud loomulikult, on inimese poolt toodetud nanoosakeste mõju keskkonnale ja tervisele veel teadmata. Sellistele küsimustele vastamiseks on tekkinud eraldi teadusharu – nanotoksikoloogia. Nanoosakeste toksilisus seisneb nende suures eripinnas, mis võimaldab raskemetalle hõlpsasti nende külge siduda ning seega kehas liikuda. Samuti on suure eripinna tulemuseks osakeste suur reaktiivsus keskkonnaga ning tänu oma mõõtmetele on nanoosakesed võimelised tungima ka läbi rakumembraanide. Kuna tegu on ka äärmiselt väikeste osakestega ei pruugi organismi kaitsemeetmed osakesi takistada. Seega on aatomkiht sadestamise - ehk ALD (*atomic layer deposition*) meetodiga kaetud nanoosakeste ja räniplaatide toksilisuse uurimine materjali turvalisuse ja vastupidavuse selgestegemiseks vajalik. [11]

1.2 Nanoosakeste süntees

Nanoosakeste kontrollitud ja efektiivne süntees on üks nanotehnoloogia valdkonna eesmärkidest. Kuigi nanoosakesi on kasutatud juba aastatuhandeid, on nende teadlik kasutamine võtnud hoogu just viimaste aastakümnete jooksul. [12] Pidevalt kasvav arusaamine nanomaailmast on meil aidanud välja töötada mitmed meetodeid nanoosakeste sünteesiks. Valdavalt võib neid meetodeid jagada kaheks: alt üles (*bottom-up*) ja ülevalt alla (*top-down*) meetodid. [13]

Kahest meetodist vanem on “ülevalt alla” meetod, mille puhul suuremad makro- või mikroosakesed purustatakse aina väiksemaks kuni jõutakse nanotasemeni. Tegemist on vägagi lihtsa ja suhteliselt kontrollimatu protsessiga. Töötlemist saab läbi viia materjali jahvatades või muul moel kulutades. Protsess kestab kuni soovitud suurusega osakesed on saavutatud. [14] Samas ei ole võimalik kontrollida osakeste täpset suurust, kuna protsess sõltub suuresti juhusest. See tekitab olukorra, kus osakestel puudub ühtne suurusjärk ja kindel kuju. Osakesed võivad olla üksteisest mõõtmete poolest kordades erinevad ning omada üksteisest sõltumatuid ebakorrapäraseid vorme. [15] Samuti on selle protsessi käigus materjalide saastus tunduvalt suurem, kuna töödeldav materjal võib ise sisaldada ebakorrapärasusi või lisaaineid ning neid pole võimalik kergesti eemaldada enne protsessi või selle käigus. Sellist materjali võidakse enamasti kasutada tootmises, kus suur hulk materjali on vajalik ning materjali absoluutne puhtus või spetsiifiline suurusjärk ja kuju pole olulised näitajad. (Joonis 2)

Sellist materjali kasutatakse näiteks reketite, kiivrite ja muude tugevust ning väikest kaalu nõudvate esemete tootmiseks. [16]



Joonis 2. Nanojahvatatud ravim Nifedipin [15]. Pilt on illustreeriv näide jahvatusmeetodist.

Uuemaks ning täpsemaks meetodiks on “alt üles” meetod. Esineb küll erinevaid variante, aga nende kõigi ühiseks tunnuseks on osakeste tootmine aatomite või molekulide kaupa. Meetodis liigutakse üksikutest aatomitest nanoosakesteni lisades osakestele aina uusi kihte – ehitades osakest väiksest suureks – alt üles. [17] Antud meetod võimaldab täpsemalt kontrollida osakeste suurust ning kuju. Seda on võimalik teha komponentide hulka, keskkonnatingimusi ja muid parameetreid muutes. Selline tootmine jaguneb omakorda kaheks: gaasi- ning vedelikeskkonnas töötavad meetodid. Järgnevalt on loetletud mõned nanoosakeste alt-üles tootmise viisid:

- Pürolüüsi korral toimub hapniku ja halogeenide vabades tingimustes osakeste sadenemine kõrgel temperatuuril loodud keskkonnast, näiteks lahusest.
- Inertsete gaaside abil sadestamine seisneb inertse gaasi kasutamises kandjana, mis aatom-aatomi kaupa materjali ladestab.
- Hüdrotermiline süntees leiab aset suletud autoklaavis ning võimaldab täpset kontrolli osakeste üle.
- Sool-geel meetodis moodustavad välja sadestuvad aatomid geelilaadse vormi, mida on võimalik edasi töödelda mitmedimensionaalseteks vormideks. [18]

Mõned meetodid on sobilikumad teatud eesmärkidele. Näiteks saab eristada vedelkeskkonnas toimuvaid reaktsioone vesikeskkonnas toimuvateks ning orgaanilistes lahustites toimuvateks. [19] Eristada saab mõju keskkonnale, kus vesilahus pole sedavõrd saastav, ning otstarbekust, kus orgaanilistes lahustes on kergem, kiirem või odavam sünteesida metalloksiidseid nanoosakesi [19].

Metalloksiidide puhul on eelistatud just orgaanilised lahused, kuna seeläbi on võimalik toota nanoosakesi võrdlemisi kiirelt ning odavalt, omades samas kontrolli protsessi ning osakeste omaduste üle. Näiteks on võimalik sool-geel meetodiga määrata metalloksiidsete nanoosakeste suurus. Seda saavutatakse reaktsiooniga või keskkonnatemperatuuri muutes. [20]

1.3 ALD meetod

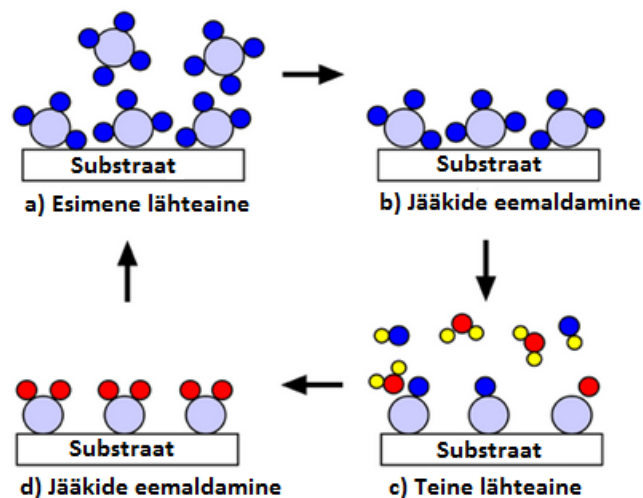
Atomic layer deposition ehk aatomkihtsadestamine on miniaturiseerimise (ehk süsteemi suuruse vähendamise) arenguga saanud aina rohkem tähelepanu. Tegu on meetodiga, mis võimaldab katta pindu üliõhukeste ainekihtidega korrapäraselt ning kontrollitult. [21]

ALD meetod on arenenud kahes paralleelses suunas. Nendeks on aatomkihiepitaksia ning molekulkihiepitamine. [22] Tegu on sarnaste põhimõtete sõltumatu arendamisega Soomes ja NSVL-is. Kuigi NSVL-i teadlased alustasid protsessi kirjeldamist juba 1960. aastatel, on just soomlase Tuomo Suntala poolt arendatud aatomkihiepitaksia ALD nime eest vastutav [23][24]. Vaatamata kahe suuna ideoloogilisele erinevusele on vastu võetud ALD kui vihmavarjutermin sarnaste protseduuride jaoks.

ALD meetod seisneb, nagu nimigi ütleb, materjali kihi kaupa ladestamises pinnale [25]. Pind võib olla tasane või korrapäratu, suur või väike – kuid kui eripära on arvesse võetud, on võimalik katta igasuguseid pindu. See protsess võimaldas ka luua esimesi elektroluminestsents valgustusi ning displeisid. Esimene TFEL (*Thin-film electroluminescent*) displei esitleti aastal 1980 ning paigaldati Helsingi-Vantaa lennujaama aastal 1983 [24]. Seega võimaldas ALD meetod luua ennenägematuid valgustussüsteeme.

ALD protsess seisneb pinna katmises lähteainetega reaktsioonikambris. Seejuures peab lähteainete tahtmatu omavahelise reaktsiooni vältimiseks kandma aineid pinnale vaheldumisi, tehes kindlaks, et pärast iga lähteaine pealekandmist allesjäänud kasutamata aine eemaldatakse. (Joonis 3.) [26] See saavutatakse tänu inertsete gaaside pumpamise reaktsioonikambrisse pärast

iga uue kihi peale kandmist. Inertse gaasiga puhastamine eemaldab kambrist lähteaine jäägid ning samas gaas ise ei reageeru substraadi ega lähteaine kihiga. Kuna lähteained on ise väga reaktiivsed, mis on vajalik tagamaks seostumist pinnaga, on tähtis hoida reaktsioonikamber puhas saastustest, milleks võib olla teine lähteaine, tahtmatu saastus või valed gaasid reaktsioonikambris. Sel viisil saab hõlpsasti määrata pinnale kantava kihtide arvu ja nende omadusi. Kuna lähteainete seostumine on samuti valitud vastavalt vajadusele, on enamus prekursorid loodud seostuma substraadile või spetsiifiliselt teisele prekursorile. Kuna prekursorid on aga vägagi reaktiivsed, võivad nad seostuda lisaks substraadile ka reaktori pinnale, mida nad ka tihti teevad. Kuigi substraadi seostumine mujale võib tunduda problemaatiline, võimaldab kihi ühemolekuline või –atomiline paksus määrata kindlalt tekkivat nanokile. See kindlustab protsessi lõppemise kui eelmise lähteaine või kaetava pinna veel reageerimata osa saab otsa ning võimaldab luua ühtlaselt kaetud pindu kust puuduvad korrapäratused. Sel viisil on võimalik määrata kihi paksust. Teades ühe kihi täpset koostist, paksust ning vajaminevate kihtide arvu, on võimalik ALD tsüklite jooksul luua pinnale nanokile vastavalt vajadusele. [26]



Joonis 3. ALD meetodil sadestamine. Substraadile kantakse esimene lähteaine, mis seostub substraadi pinnaga (a) lähteaine jäägid eemaldatakse (b). Lisatakse teine lähteaine, mis reageerib esimesega, asendades selles tahetud osad (c). Teise lähteaine jäägid ning kõrvalproduktid eemaldatakse, jättes substraadile kahest prekursorist koosneva kihi (d). Modifitseeritud. [26]

ALD protsessi puhul mängib kesksel rolli reaktsioonitemperatuur. Muutes temperatuuri on

võimalik mõjutada substraadi pinnaga toimuvat seostumist nii, et see soosiks prekursori keemilist seostumist pinnale ning vältida füüsikalist seostumist van der Waalsi jõudude läbi, mis võivad tekitada ebakorrapärasusi. See seisneb keemilise sideme kõrgemast energiast füüsikaliste sidemete üle. See omakorda võimaldab vältida van der Waalsi jõudude tõttu seostunud osakeste hulka tõstes temperatuuri piirini kus van der Waalsi jõud on liialt nõrgad, et molekulide ja aatomeid siduda, kuid kus keemiliste sidemete energia on veel piisav, et vältida nanokile dissotseerumist. Seeläbi saab kindlustada, et seostub ainult monomolekulaarne kiht ning kihis puuduvad augud, künkad või muud korrapäratused. [27] [28]

ALD materjalide valimisel tuleb meeles pidada teatud iseärasusi. Näiteks, kuigi prekursorid võivad olla mitmekesised, peavad need olema kas gaasi kujul või piisavalt lihtsasti aurustuvad, et luua piisavalt rikas keskkond seostumiseks. Nii võivad prekursorid olla orgaanilised, mitteorgaanilised kui ka metalloorgaanilised. [30] See on võimalik juhul kui need on piisavalt aurustumisvõimelised. Samuti peab vältima prekursorite võimalikke omavahelisi reaktsioone. Seda on võimalik vältida reaktsioonikambri inertgaasidega puhastamisega. Probleemsemaks on näiteks prekursorite lagunemine substraadil. See võib tekitada lähteainete ebaspetsiifilise seostumise kihile, rikkudes seega ALD protsessi tulemusi. Kuigi sarnaseid parameetreid tuleb jälgida, on temperatuur siiski määravaks teguriks korrektse ALD protsessi läbiviimisel. [29]

1.4 Nanotoksikoloogia

Nanotoksikoloogia on nanoosakeste kahjulikku mõju kirjeldav ning uuriv teadusharu, mis sai alguse nanoosakesi käsitlevate artiklite ilmumisega alates 1998. aastast ning nendega seotud ohtust käsitlevate artiklite ilmumisega aastast 2001. [31] Nanotoksikoloogia käsitleb nanoskaalal, suurusel 1-100 nm, osakeste reaktsioone organismidega. Teadusharu areng käib käsi-käes nanotehnoloogia arenguga, pakkudes informatsiooni uute avastuste potentsiaalsete ohtude kohta. Põhjus miks nanotoksikoloogia eraldiseisev on, tuleneb nanoosakeste erilistest omadustest. Nimelt esineb materjalide nanokujul makrokujust erinevaid omadusi. See tuleneb nanoosakeste suuremast puhtuseastmest, suuremast eripinnast, ühtlasemast kristallstruktuurist, elektrijuhtivusest, lahustuvusest, kujust ja teistest omadustest, mis makrokujul võivad omada erinevat mõju nanotasemest. [32] Seega võib makrokujul igapäevasena tunduv materjal omada nanokujul etteootamatuid omadusi, mis võivad selle muuta väärtuslikuks. [33] Teadusharu kõikide nende materjalide nanoosakeste võimalike ohtude uurimiseks, kuna makrotasemel üldtuntud faktid ei pruugi nanotasemel paika pidada, ongi nanotoksikoloogia.

Nanoosakeste toksilisuse peamiseks põhjuseks on nende suur eripind. Kuna väikesel osakesel

on oma ruumala kohta suur pind, on nanoosakesed võimelised endaga siduma suure hulga raskemetalle või muid ohtlikke aineid ning seejuures säilitama oma võime liikuda organismis ja isegi rakkudes enestes hõlpsasti ringi. [34] Kuna organismidel puudub mehhanism inimtoodetud nanoosakeste kehast eemaldamiseks, võib tekkida olukord kus nanoosakesed ja nendega seotud mürgid kuhjuvad kehas. [35] Seni uuritud ainete hulgast on esile kerkinud 14 mürgisemat. Nende hulka kuuluvad näiteks hõbeda ja raua nanopartiklid, titaanoksiid nanopartiklid, nanosavid, C₆₀ fullereenid, nanotorud. Sellele vaatamata on ka need ained jätkuvalt kasutusel. Näiteks võib leida fullereene kosmeetikas, meditsiinis, elektroonikas ja ka näiteks diiselmootorite heitgaasis. C₆₀ fullereenide mõju aga võib olla vägagi tõsine. Näiteks 2004. aastal USA-s korraldatud katse käigus lisati akvaariumisse 0,5 mg C₆₀ fullereeni. Selle tulemusena tekkisid muutused nii kalades kui akvaariumivees. Kalade lõpustes, maksas ning ajus täheldati kahjustusi ning vee selgenemisest võis tuletada fullereenide bakteriotsiidseid omadusi. [36] Nende negatiivset mõju valgusvabas keskkonnas pole täheldatud. Küll aga päiksevalguse või halogeenlampide juuresolekul võivad fullereenid tekitada DNA ja kromosoomide struktuurseid kahjustusi läbi hapnikuradikaalide sünteesi [28]. Arvestades nanoosakeste väikest hulka ning selle suurt mõju on nanoosakeste toksilisuse uurimine igati põhjendatud. Uuringuid osakeste toksilisusest viiakse läbi nii füüsiliselt elusolenditel, olgu selleks siis katseloomad või rakud, kui ka simulatsioonides, kusjuures arvutite jõudluse ja nanotoksikoloogia teadmise kasvuga on üha enam eelistatud simulatsioon. [38] Katseloomadega tehtud katsed seisnevad loomade paljastamises uuritud ainetele. See võib väljenduda uuritavate ainete lisamisega toidu- või veevarudesse. Samuti võib kokkupuude tekkida inhalaatoreid kasutades või läbi nahale kandmise. [39] Kokkupuude võib kesta korra, nädala, mitmeid kuid või eluaja, olenevalt uuritud ainest ja katseloomast. Peamine meetod käesolevas töös on katsed loomsete fibroblasti rakkudega, mis võimaldab uurida nanoosakeste mõju väiksel skaalal. Rakkude arvukus ning kasv on peamised näitajaid rakkude eduka elutegevuse jaoks. Selleks on antud töös uuritud just neid parameetreid. Uuritud on nanomaterjalide mõju rakkude kasvule, proliferatsioonile ning apoptoosile. Selleks kasutatakse rakkude arvukuse määramiseks Luminescent Cell Viability Assay kitti (Promega, USA) kit-I, mis määrab rakkude arvukuse lineaarselt läbi olemasoleva ATP. Prolifereeruvaid ning apoptootilisi rakke toodi esile vastavalt Ki-67 ning TUNEL kit-iga florestsents värvimisel. Rakkudega teostatud katsed lihtsustavad samuti rakkude arvukuse ja morfoloogia muutuste jälgimise nanoosakeste juuresolekul.

1.5 Fibroblastid

Fibroblastid on ekstratsellulaarsed maatriksit ning kollageeni sünteesivad rakud [40]. Termin fibroblast hõlmab endas hulka sarnaseid raku sarnaste funktsioonidega. Tegu on levinuma sidekoe rakutüübiga ning morfoloogiliselt vägagi heterogeense rakutüübiga. Omades suurt hulka erinevaid funktsioone organismi eri punktides, on fibroblastid vastutavad mitte ainult naha struktuuri vaid ka näiteks haava sulgemise ja teiste tugirakkude loomise eest. Fibroblastid pärinevad, sarnaselt teistele sidekoe rakkudele, primitiivsest mesenhüümist. [41] Selle tulemusena ekspresseeritakse neis intermediaarsed filamendivalgu vimentiini. Tegu on tsütoskeleti komponendiga, mida leidub paljudes loomsetes rakkudes. Antud valku saab seetõttu kasutada raku mesodermaalse päritolu tuvastamiseks [42]. Tegu pole aga ainulaadse omadusega, kuna ka söötmel kasvanud epiteelrakud võivad vimentiini ekspresseerida [43]. Samuti on võimalik epiteelkoe rakkude muutumine fibroblastideks. Antud fenomeni nimetatakse epiteelial-mesenhümaalseks üleminekuks (EMT- *epithelial-mesenchymal transition*). [44] Sarnaselt sellele on aga ka võimalik vastupidine olukord, kus fibroblast muutub epiteelkoe rakuks. Seda protsessi nimetatakse vastavalt epiteelial-mesenhümaalseks üleminekuks (MET- *mesenchymal-epithelial transition*). [45] MET protsessi käigus omandab eelnevalt kindla kujuta fibroblast polaarsuse ning lateraalse ühenduse kõrvalolevate rakkudega, mis on tüüpiline epiteelialsele rakukihile. Antud protsessi on täheldatud paljudes arengusituatsioonides näiteks nefroni ja notokordi arengus. Samuti leiab MET aset haavade sulgumisel ning tumorigeneesis. [46] [47]

Oma kujult on fibroblastid suured lamedad rakud hargnenud tsütoplasma jätketega, mis ümbritsevad lamedat ovaalset rakutuumat. Rakutuum ise sisaldab kahte või enam tuumakest. Aktiivseid fibroblaste on võimalik eristada tänu nende rohkele karedapinnalisele endoplasmaatilisele retiikumile (ehk tsütoplasma võrgustik). Seevastu inaktiivsed fibroblastid on suuruselt väiksemad, otstest teravnevad ning omavad vähem karedapinnalist ER-I. [48] Kudedes ei paikne fibroblastid kihtidena, erinevalt näiteks epiteelist, vaid asuvad hajusalt koe sees laiali, ei moodusta rakukihet ega oma polaarsust ning ei kinnitu basaalmembraanidele. [41] Sellele vaatamata võivad fibroblastid teatud olukordades toetada basaalmembraani sünteesi. Näiteks toimub selline protsess subepiteelialsete müofibroblastidega, mis võivad sekreteerida α -2 ahelat kandvat laminiini komponenti, mis puudub ainult soolepiirkondades, kust on puudu ka müofibroblastid. [49] See on jällegi näide fibroblastide olulisusest keha struktuuris. Kuigi fibroblastid paiknevad enamjaolt üksikult ning hajusalt, on tiheda asustuse korral võimalik nende organiseerumine klastritesse, mistõttu omandavad klastris olevad rakud ühtlase kuju. Muude eripärade hulka kuulub ka näiteks võime liikuda söötmel, erinevalt teistest epiteelkoe

rakkudest. [50] Fibroblastid sünteesivad lisaks eelmainitud kollageenile ka glükosaminoglükaane, retikulaarseid ja elastseid fiibreid, ekstratsellulaarses maatriksis (EM) leiduvaid glükoproteiine ning tsütokiini TSLP (tüümuse stromaalne lümfoepoetiin). Seega on fibroblastidel lisaks struktuursele funktsioonile ka regulatoorne roll organismis. [51] Aineid, mida sünteesitakse, et tagada sidekudede struktuurne terviklikus, nimetatakse ekstratsellulaarse maatriksi prekursoriteks. Fibroblastid sünteesivad kõiki EM osade prekursoreid. Eelkõige sünteesitakse erinevaid fiibreid ja baasaineid, mis väljaspool rakku, mõned ise, mõned teiste rakkude kaasabiga, omandavad struktuuraalselt olulise kuju. [52] Aktiivse kasvuga indiviidide fibroblastid prolifereruvad ning toodavad vajalikke materjale ekstratsellulaarse maatriksi sünteesiks ning ka muude koeosade loomiseks. Vastupidiselt epiteelkoe rakkudele, mis moodustavad organismi katva kihi, on fibroblastid ja nendega seotud sidekoed vastutavad suurosa organismi tugistruktuuride eest. Sinna hulka kuuluvad näiteks luud, kõhred jne. [53] Fibroblastid on samuti näidanud võimet säilitada informatsiooni eelneva asukoha kohta ning diferentseeruda teisteks koetüüpideks nagu luukude ja kõhrkude. Fibroblastide diferentseerumine mängib rolli haavade sulgemises. Nimelt diferentseeruvad fibroblastid haava korral silelihaskoe rakkudeks ning võimaldavad seeläbi haava sulgemist, tõmmates haava kahte poolt kokku [54]. Fibroblastide võime säilitada informatsiooni on näidatud katsetes hiirte varvaste amputeerimisega, kus vastavalt lõikekohale võisid varbad tagasi kasvada. Fibroblastid on kehas laialt levinud ning mängivad tähtsat rolli keha struktuuri säilitamises. [55]

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

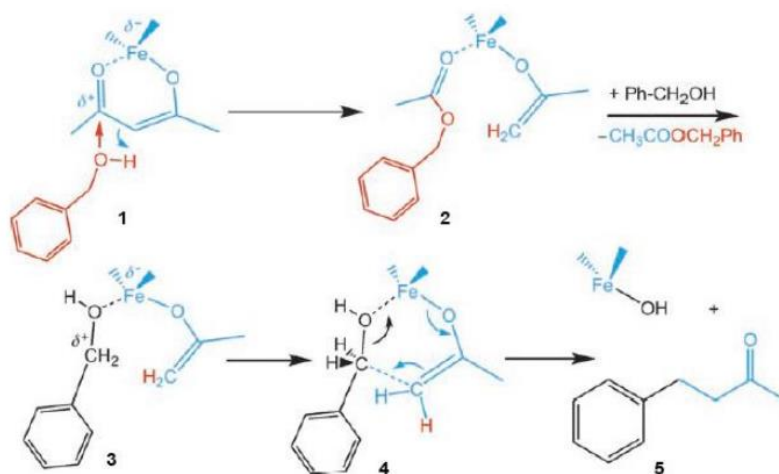
2.1 Töö eesmärk

Töö eesmärk on uurida ALD meetodiga kaetud raua nanopartiklite ja räniplaatide mõju inimese fibroblastidele ning võrrelda kaetud ja katmata materjalide toksilisust rakkudele.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Nanoosakesed, ALD materjalid ning fibroblastid

Antud töös kasutatavad nanoosakesed on sünteesitud sool-geel meetodi erijuhuga, kus reaktsioon lõpetatakse enne lahuse geeljaks muutumist. Kasutatud on bensüülalkoholi meetodit, mis seisneb bensüülalkoholi reageerimisel metalli atsetüülatsetonaaadiga. Reaktsioon põhineb aldoolkondensatsioonile, kus atsetüülatsetonaaat osaleb algselt solvolüüsis ning seejärel toimub aldoolkondensatsioon (Joonis 4.).



Joonis 4. Raud(III)atsetüülatsetonaaadi ning bensüülalkoholi vaheline reaktsioon.

Bensüülalkohol reageerib nukleofiilselt atsetüülatsetonaaadi ligandi ühe karbonüülrühmaga (1). Alkoholüüsi protsessis tekivad bensüülatsetaat ning enolaadi ligand (2). Bensüülalkohol liigub Fe tsentrisse ning vabastab seega bensüülatsetaadi ligandi vahetusreaktsiooniga. Sellele järgneb nukleofiilse enolaadi ligandi reaktsioon bensüülalkosiidiga (3,4). Viimaks vabaneb 4-fenüül-2-butanoon ning Fe-OH. Rauaga seotud hüdroksüülrühm kinnitub teise raua tsentri külge ning algab nanoosakese teke (5). [37]

Reaktsioon toimub autoklaavis 200°C juures 48 tunni vältel. Reagendid asuvad kinnijoodetud klaasampullis. Protsessi tulemusena sünteesiti 60-2000 nanomeetri suuruseid raua nanopartikleid. Näide ampullist alloleval pildil:



Joonis 5. Raud(III)atsetüülatssetonaadi ja bensüülalkohili reaktsioonide saadused erinevatel temperatuuridel 30 minuti vältel. [38]

Osakesed on sünteesitud Tartu Ülikooli Füüsika Instituudi magistriõppe üliõpilase Peep Uudekülli poolt tema bakalaureuse töös “Metalloksiidsete nanoosakeste süntees ja karakteriseerimine” kirjeldatud meetodi alusel.

Töös kasutatavad raua nanoosakesed on ALD meetodil kaetud Tartu Ülikooli Füüsika Instituudi magistriõppe lõpetanud Peep Uudekülli töö – „Atomic Layer Deposition of Titanium Oxide Films on As-Synthesized Magnetic Metal (Oxide) Nanoparticles“ raames. Osakesed on kaetud 10 nm paksu titaandioksiid (TiO_2) kihiga. Osakesed saabusid kuivainena ning muudeti lahuseks kohapeal, lisades vastava koguse PBS lahust, et saavutada 200 mg/ml kontsentratsioon. Osakesi hoiustatakse toatemperatuuril ilma otsese valguseta.

Töös kasutatavad räniplaadid on saadud koostöös Tartu Ülikooli Füüsika instituudi materjaliteaduse vanemteaduri Aile Tamme töögrupiga. Tegu on erikujuliste räniplaadi tükkidega mis on eelnevalt kaetud RuO_x kihiga ning millele kantakse omakorda ALD meetodiga titaan(IV)oksiidi ning tantaan(III)oksiidi kiht. Kihi paksus määratakse tootmise käigus ning selleks on hetkeproovide puhul 4 nm.

Töös kasutatud inimese fibroblastid on saadud Tartu Ülikooli Kliinikumilt. Rakud on erinevatest protseduuridest saadud koeproovidest eraldatud. Rakke kasvatati koekultuuri söötmel (Tabel 1.) 37°C ja 5% CO₂ sisaldusega keskkonnas koekultuuri inkubaatoris. Vastavalt vajadusele külmutati rakke edasiseks kasutuseks -80°C juures. Külmutamiseks on kasutatud 1:9 DMSO (SIGMA-ALDRICH, Inglismaa) lahust FBSis (*fetal bovine serum*) (ThermoFisher Scientific, USA). Rakud eraldati söötmest tsentrifuugimise (*Mikro 200R, Hettich Lab technology*, Saksamaa) teel, lisatakse DMSO lahus ning asetatakse isopropanooli sisaldavas külmutuskastis -80°C külmikusse. Pärast sulatamist lisatakse lahus 20 ml söötmesse, vähendamaks DMSO kahjulikku mõju rakkudele. Seejärel fuugitakse rakud põhja ning eemaldatakse sööde, asendades see 10 ml uue söötmega. Rakud kasvavad seejärel 48h inkubaatoris (Sanyo CO₂ incubator MCO-18AIC(UV), Jaapan) 37°C ja 5% CO₂ sisaldusega keskkonnas 12-kannulisel plaadil (Corning, USA).

Tabel 1. Rakukultuuride kasvatamises kasutatud sööde.

Komponent	Hulk	Tootja
<i>IMDM with HEPES and L-glutamine</i>	lahusti	Lonza, Šveits
FBS	1/10	ThermoFisher Scientific, USA
penitsilliin-streptomütsiin	1/100	ThermoFisher Scientific, USA

2.2.2 Raua nanopartiklid

2.2.2.1 Rakkude arvukuse mõõtmine

Esmalt teostati kaetud nanopartikkelitega kasvanud rakkude arvukuse mõõtmine kasutades *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* kitti (Promega, USA). Kiti abil mõõdetakse ATP koguse alusel elusate rakkude arvukust, kasutades olemasolevat ATP-d lumineestseeruvaks reaktsiooniks. Signaali tugevuse alusel arvutatakse rakkude hulk. Kontrollimaks kiti sobivust ja leidmaks sobilik rakkude arv, teostati eelnevalt katse rakkudega DMSO ja NSC156529 [59]

mõju all ning mõõdeti arvukust kiti alusel. NSC156529 ja DMSO kasutati, et rakkude kasvu pärssivas keskkonnas tuvastada optimaalne rakkude arv immunofluorestsents mikroskoopia teostamiseks. Katse jaoks kasutatavad rakud eemaldati petri tassidelt (Sigma-Aldrich, USA) pestes neid korra PBS ühekordse lahusega ning lisades seejärel 5 ml 0,5% trüpsiinilahust (Sigma-Aldrich, USA) ning inkubeerides tassi 3 min 37°C ja 5% CO₂ sisaldusega keskkonnas (Sanyo CO₂ inkubaator MCO-18AIC(UV), Jaapan). Seejärel lisati trüpsiinisegu koos rakkudega 20 ml söötmesse ja tsentrifuugiti rakud. Pealt eemaldati sööde koos trüpsiiniga ning lisati 10 ml uut söödet. Määrati rakkude kontsentratsioon rakke mikroskoobi all loendades ning rakud jagati 96 kannulisele plaadile (Greiner CELLSTAR, Austria) vastavalt alltoodud skeemile (Tabel 2.):

Tabel 2. Proovide jaotus 96-kannulisel plaadil rakkude arvukuse mõõtmise kontrolliks.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	a				b				c			
B												
C	d				e				f			
D												
E	a*				b*				c*			
F												
G	d*				e*				f*			
H												

a – puhas sööde

b – rakud

c – DMSO (1/1000 PBSis) koos rakkudega

d – NSC156529 (1/1000 PBSis) koos rakkudega

e – DMSO (1/3000 PBSis) koos rakkudega

f – NSC156529 (1/3000 PBSis) koos rakkudega

Tärnita kannus 3000 ning tärniga

kannus 4000 rakku kannu kohta

Rakkudel lasti kasvada 48h ning seejärel alustati kitiga töötlemist. Kannudest eraldati eelnev sööde ning lisati 50 µl uut söödet (Tabel 1.) ja 50 µl vastavalt juhiste valmistas reagenti CellTiter-Glo®. Plaat viiakse masinasse (infinite 200Pro, Tecan, Šveits) ning programmi jooksul raputatakse plaati 120 sekundit. Sellele järgneb 10 minutiline ooteperiood, mille järel mõõdetakse signaal. Olles kinnitanud kiti sobivuse ning leidnud sobiliku rakuarvu, alustatakse nanoosakeste katset.

Nanoosakestega tehtud katsed teostati sarnase plaani alusel. Rakud eemaldati petri tassilt (Falcon 100/20 mm, Corning, USA) ning määrati kontsentratsioon lahuses. Seejärel jagati rakud kahele plaadile, 3000 rakku kannu kohta. Ühele plaadile lisati raua nanoosakesi katteta ning teisele raua osakesi titaan dioksiid (TiO_2) kattega (Tabel 3).

Tabel 3. Erineva kontsentratsiooniga nanoosakeste jaotus 96-kannulisel plaadil.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		a				b				c		
B		a				b				c		
C		d				e				f		
D		d				e				f		
E		g				h						
F		g				h						
G												
H												

a – puhas sööde

b – sööde koos osakestega

c – rakud ilma osakesteta

d – 2 mg/ml osakesi

e – 1 mg/ml osakesi

f – 0,5 mg/ml osakesi

g – 0,25 mg/ml osakesi

h – 0,125 mg/ml osakesi

Sellele järgnes identne programm luminomeetris (infinite 200Pro, Tecan, Šveits) mille käigus määrati rakkude arvukus erinevate osakeste kontsentratsioonide juures. Samuti teostati valgusmikroskoopia, mõistmaks rakkude käitumist nanoosakeste juuresolekul. Mikroskoopia puhul vaadeldi nanoosakestega kannudes 48-tundi kasvanud rakke. Valgusmikroskoopiat teostati valgusmikroskoobiga (Olympus IX81, Jaapan).

2.2.2.2 Immunofluorestsentsmikroskoopia

Mõistmaks rakkude käitumist nanoosakeste juuresolekul kasutati immunofluorestsentsmikroskoopiat. Selleks basseeriti rakke 24-kannulisse plaati (Corning, USA) kontsentratsiooniga 20 000 rakku kannu kohta. Iga kannu põhja paigutati eelnevalt klaasplaat millele rakud kinnitusid. Rakud jagati kolme rühma: rauast katteta osakesed, raua osakesed TiO₂ kattega ning kontrollgrupp rakkudest ilma nanoosakesteta. Iga grupp koosnes neljast kannust. Vältimaks ebaspetsiifikat blokeeriti rakud 5% eesliseerumis PBS-is 30 minutit toatemperatuuril. Järgnes KI-67 primaarse antikeha lisamine lahjendatult 5% eesliseerumis (50 µl/kann). Selleks pipeteeriti parafilmi (Bemis, USA) lõigule lahus ning asetati klaasplaadid tilkadele. Rakke inkubeeriti 60 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti rakke 3 korda 5 minutit PBS-iga. Järgnes Ki-67 sekundaarse antikeha (eesli küüliku vastane) pealekandmine lahjendusega 1/1000 5% eesliseerumis. (Tabel 4.) Jällegi asetatakse klaasid parafilmil olevate tilkade peale ning inkubeeritakse 60 minutit toatemperatuuril. Rakke pestakse seejärel 3 korda 5 minutit PBS-iga. Tsütoskeleti värvimiseks pipeteeritakse parafilmile Phalloidin488 värvi (50 µl/kann) ning asetatakse klaasid peale ning inkubeeritakse 30 minutit toatemperatuuril. Klaase pestakse uuesti 3 korda 5 minutit. Lõpuks värvitakse rakke 0,1% DAPI lahusega parafilmil, inkubeerides 20 minutit toatemperatuuril. Toimub viimane pesu 3 korda 5 minutit PBS-iga. Pärast värvimist valmistatakse preparaadid, kasutades *Fluorescent Mounting Medium* (Dako, Taani) ning *StarFrost* alusklaasi (Waldemar Knittel, Saksamaa), sulundades klaasplaadid alusklaasile. Pärast ööpäevast inkubeerimist alustatakse immunofluorestsentsmikroskoopiaga. Pildistamiseks kasutatakse mikroskoobil (Olympus IX81, Jaapan) olevat kaamerat.

Tabel 4. Immunofluorestsentsvärvimises kasutatud reagentid.

Komponent	Lahus	Millega seondub	Tootja
Ki-67 antikeha (jänese)	1/500	Prolifereeruvad rakutuumad	Sigma-Aldrich, USA
AlexaFluor647 (kitse jänese vastased)	1/1000	Ki-67 antikeha	Sigma-Aldrich, USA
Phalloidin488	1/40	Tsütoskelett	Sigma-Aldrich, USA
DAPI	1/1000	Rakutuum	Sigma-Aldrich, USA
Eesliseerum PBS-is	5%	Ebaspetsiifilised seondumiskohad	Sigma-Aldrich, USA

2.2.3 Si plaadid

Räniplaatide puhul on tegemist metallilise räniplaatidega, mis on kaetud RuO_x kihiga ning on ALD meetodiga kaetud erinevate titaani ja tantaani oksiidide kihtidega. Kattekihid, nii mitmekui ühekomponentsed, on 4 nm paksud. Tabel 5. kirjeldab viite uuritud räniplaati, sealhulgas ilma katteta räniplaat ning ruteeniumoksiidiga kaetud räniplaati:

Tabel 5. Räniplaatide nanokilede koostis.

Räniplaat	1	2	3	4	5
Kihi koostis	Ta_2O_5	Ta_2O_5	TiO_2	NA	RuO_x
		TiO_2	Ta_2O_5		
		Ta_2O_5	TiO_2		
Kihi paksus	4 nm	4 nm	4 nm	NA	NA

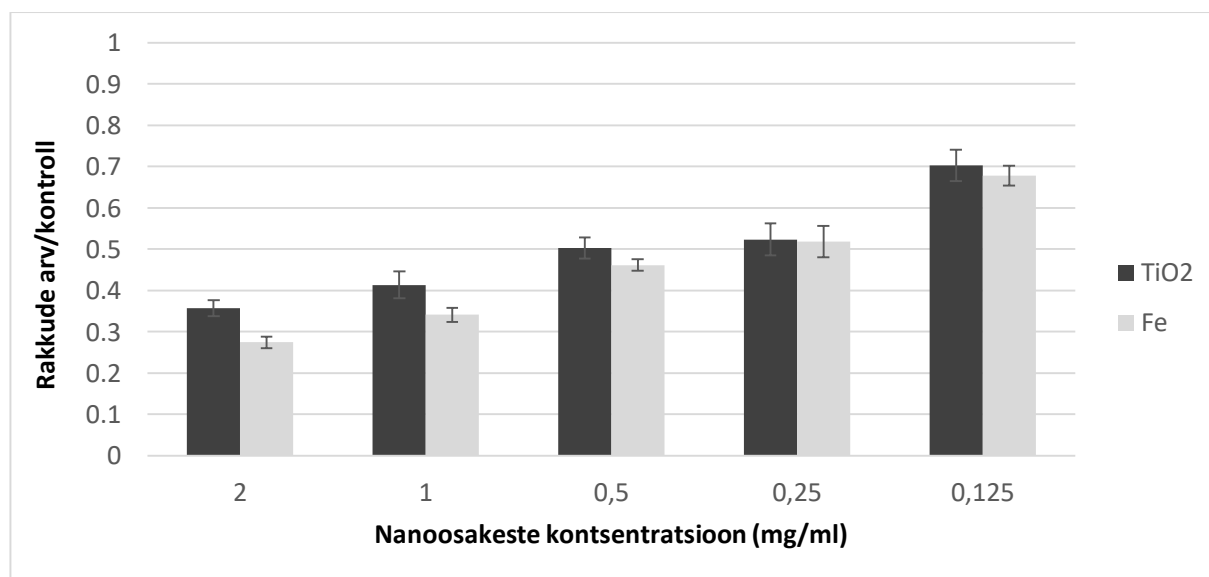
Plaate hoiti kuni katse alguseni kuivas ja eemal otsesest valgusest. Katse käigus oldi hoolikad, et vältida kahjustusi räniplaatide pinnale, mis võiks vigastada nanokihti. Kasutatakse *Click-iT® Plus TUNEL Assay* (ThermoFisher Scientific, Leedu) kitti, et värvida apoptootilisi rakke ning DAPI-t, Falloidin488 ning Ki-67 antikeha, et detekteerida rakutuuma, tsütoskeletti ning rakkude proliferatsiooni. Katse kava on valdavalt identne raua nanoosakestega kasvanud rakkude värvimisele. Erinevus väljendub rakkude kasvatamises: katseks kasvatati inimese fibroblastide eelmiste katsete vältel kultiveeritud rakkudest, mis eelnevalt külmutati. Enne katse algust kasvatati rakke 48 tundi inkubaatoris, misjärel tehti kindlaks rakkude kontsentratsioon. Rakud pannakse kasvama 24 kannulisele plaadile mille sisse esmalt asetati 5 uuritavat räniplaati. Igas kannus on sarnaselt eelmisele tööle 20 000 rakku. Edasi teostati rakkude fikseerimine, permeabiliseerimine ja immunofluorestsentsvärvimine. Vältimaks ebaspetsiifikat blokeeriti rakud 5% eesliseerumiga PBS-is 30 minutit toatemperatuuril. Järgnes KI-67 primaarse antikeha (küülik) lisamine lahjendatult 5% eesliseerumis. Selleks pipeteeriti parafilmi (Bemis, USA) lõigule lahus ning asetati räniplaadid tilkadele. Rakke inkubeeriti 60

minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti rakke 3 korda 5 minutit PBS-iga. Järgnes Ki-67-le seonduva Alexa594-florestseeruva värviga konjugeeritud sekundaarse antikeha (eesli küüliku vastane) pealekandmine lahjendusega 1/1000 5% eesliseerumis. Jällegi asetatakse räniplaadid parafilmil olevate tilkade peale ning inkubeeritakse 60 minutit toatemperatuuril. Rakke pestakse seejärel 3 korda 5 minutit PBS-iga. Tsütoskeleti värvimiseks pipeteeritakse parafilmile Phalloidin488 värvi (50 µl/kann) ning asetatakse räniplaadid peale ning inkubeeritakse 30 minutit toatemperatuuril. Plaate pestakse uuesti 3 korda 5 minutit. Lõpuks värvitakse rakke DAPI lahusega parafilmil, inkubeerides 20 minutit toatemperatuuril. Toimub viimane pesu 3 korda 5 minutit PBS-iga. Räniplaatide mikroskoopia teostati mikroskoobi ja kaameraga (Olympus IX81).

2.3 Tulemused

2.3.1 Nanoosakeste pärssiv mõju fibroblastide kasvule

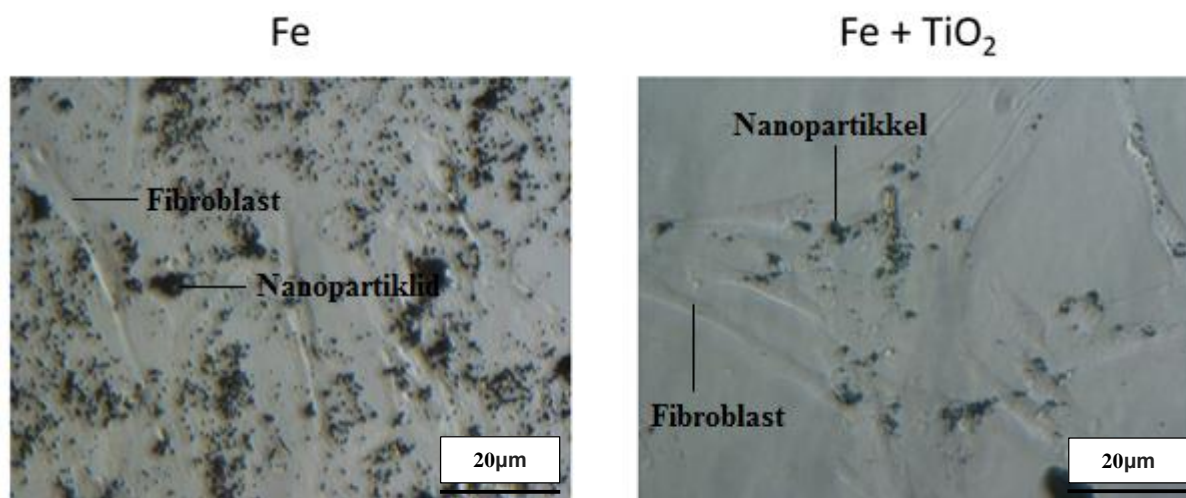
Kuna antud töö eesmärgiks on iseloomustada titaanoksiidiga kaetud nanopartiklite ja räniplaatide mõju inimese fibroblastidele, teostati rakkude arvukuse mõõtmine. Kasutatud *Luminescent Cell Viability Assay* kitt lubab rakkude arvukuse hindamist ATP alusel lineaarse seosega. See tähendab, et ATP hulk vastab lineaarselt rakkude hulgale, võimaldades seeläbi rakkude kasvu hinnata. (Joonis 6.)



Joonis 6. Nanoosakestega kasvanud rakkude arvukus osakeste kontsentratsioonist sõltuvalt.

Ei esine olulist vahet raua nanopartiklite kaetud ja katmata variantide vahel. Ka kuues korduses tehtud katse ei tõsta esile statistiliselt olulist vahet kahe nanoosakeste puhul. Tuleb aga märkida, et katmata raua osakesed näivad olevat konstantselt madalama rakkude arvuga. Enamjaolt langeb see veapiiridesse ning pole seega oluline. Vahe esineb kõrgete osakeste kontsentratsiooni juures (2 ja 1 mg/ml puhul). Samuti on märkimisväärne veapiiride vähene kattuvus, eriti 2 mg/ml kontsentratsiooni juures.

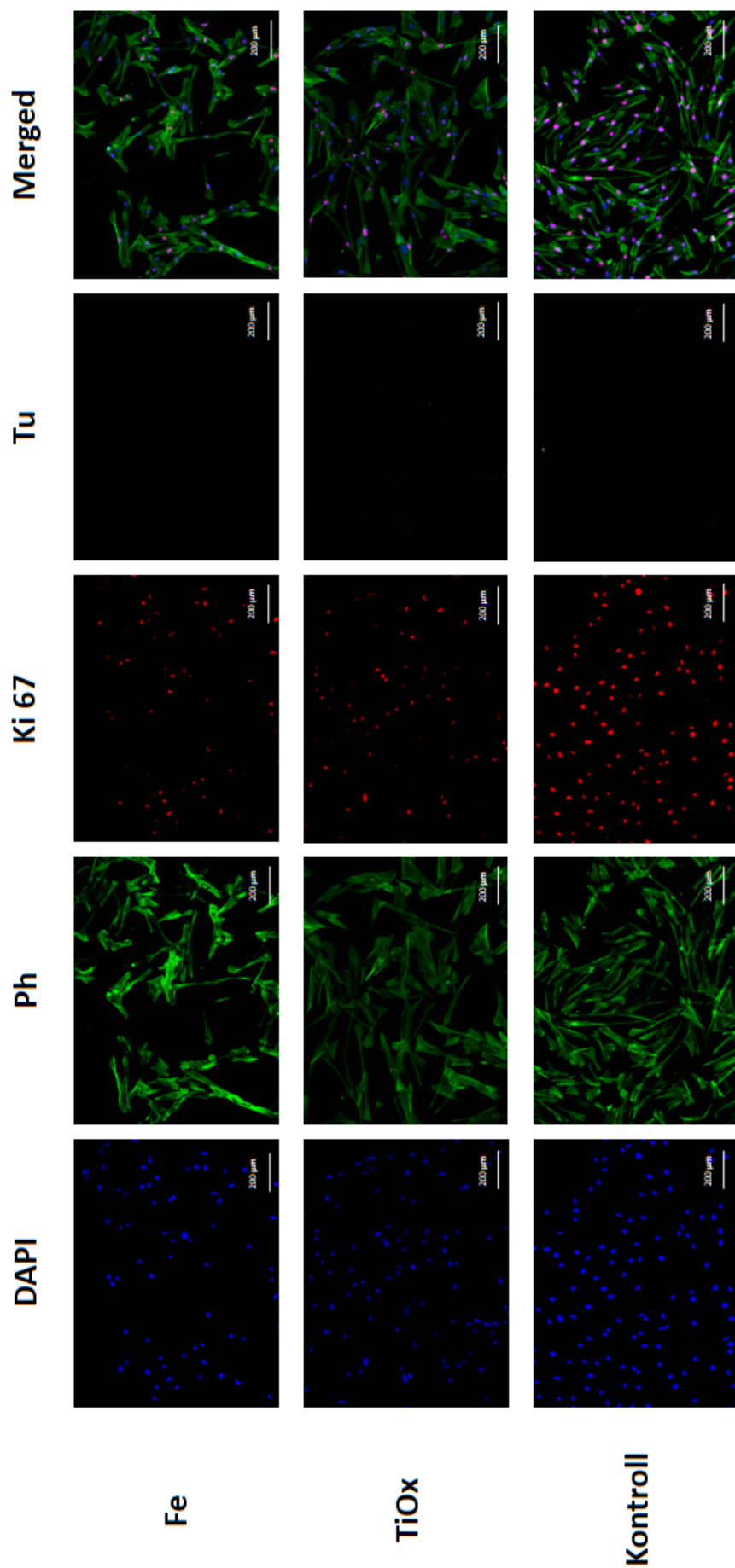
Samuti viidi nanoosakeste ja fibroblastide vaheliste reaktsioonide paremaks mõistmiseks läbi valgusmikroskoopia. Vaadeldi osakeste paigutumist rakkude ümber, et kirjeldada täpsemini nende võimalikke interaktsioone. Piltidel on näha nanoosakeste koondumist suuremateks ning väiksemateks klastriteks. Samuti on näha osakeste koondumist rakkude vahetus läheduses. (Joonis 7.)



Joonis 7. Fibroblastid 1 mg/ml nanoosakeste lahuses. Piltidel on näidatud nanoosakesed ja fibroblasti rakud.

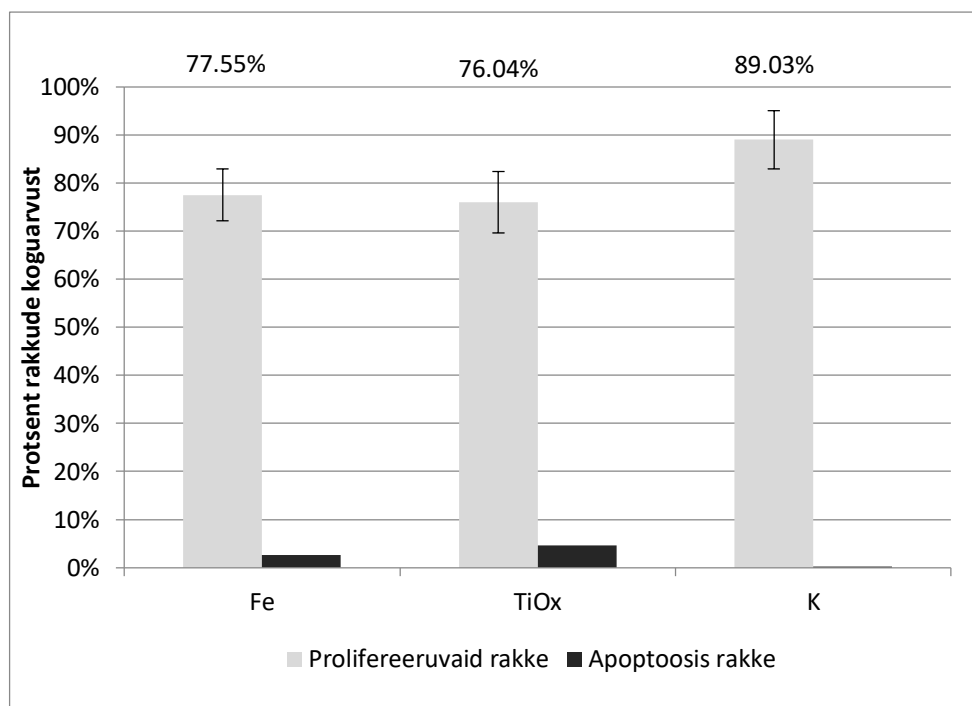
2.3.2 Nanoosakeste mõju rakkude proliferatsioonile ja apoptoosile

Teades, et rakkude arvukus langeb nanoosakeste juuresolekul vaatamata katte olemasolule, oli järgmiseks sammuks rakkude apoptoosi ning proliferatsiooni mõõtmine. Teostatud immunofluorestsentsmikroskoopia võimaldab esile tõsta apoptootilisi, prolifereruivaid ning statsionaarseid rakke. (Joonis 8.)



Joonis 8. Rauast kaetud ning katmata nanoosakestega keskkonnas kasvanud fibroblastide immunofluorestsentsvärvimise tulemused. DAPI – ga on värvitud rakutuumi, falloidiiniga (Ph) värvitud tsütoskeleti, Ki-67-ga värvitud prolifereruvaid rakutuumi ning TUNEL kit-iga (Tu) apoptoetilisi rakke. Koondpildile on toodud eelneva nelja värvi koondpilt. Pildid on 10x suurenduses.

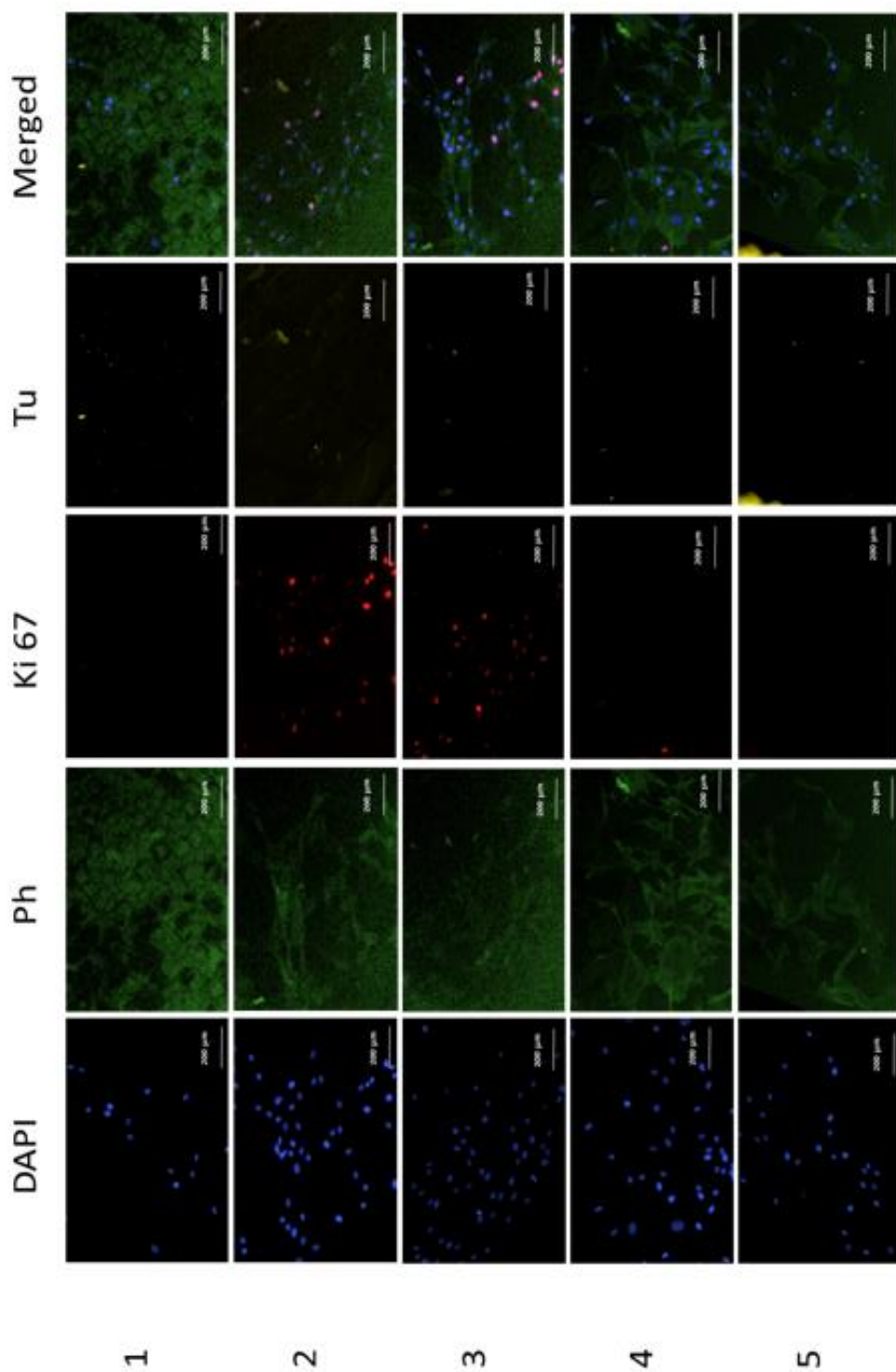
Immunofluorestsentsvärvimisest on näha nanoosakestega kasvanud rakkude väiksem arvukus. Seda kinnitab nii DAPI-ga, kui ka falloidiini-ga värvimine. Samuti on osakestega kasvanud rakud kontrollgrupist vähem prolifereeruvad. Samas pole täheldatud olulist apoptootiliste rakkude arvukuse tõusu kummaski osakeste seerias. Pärast pildistamist teostati samade rakkude arvukuse loetus. Eristati rakkude üldarvu, prolifereeruvaid ning apoptootilisi rakke. Loetluse alusel on näha et apoptootiliste rakkude osakaal on valdavalt väike (alla 5%). (Joonis 9.)



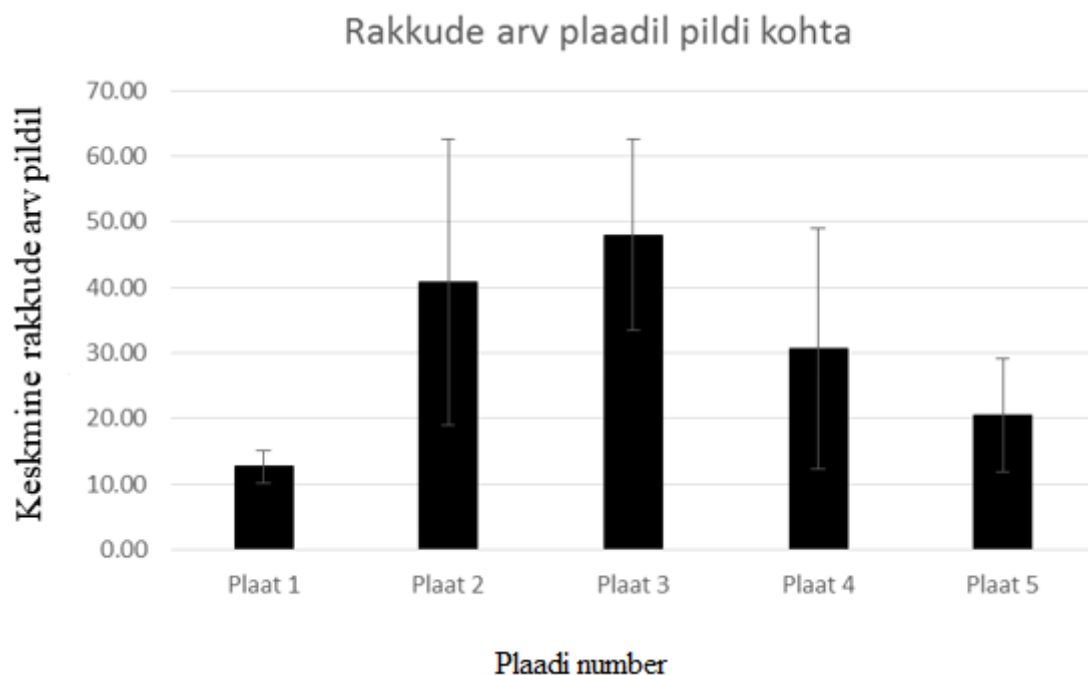
Joonis 9. Nanoosakestega kasvanud rakkude prolifereeruvate ning apoptootiliste rakkude osakaal rakkude üldarvuga võrreldes. Prolifereeruvate ning apoptootiliste rakkude protsent rakkude koguhulgast koos väljatoodud veapiiridega.

2.3.3 Nanokilega räniplaatide mõju rakkude proliferatsioonile ja apoptoosile

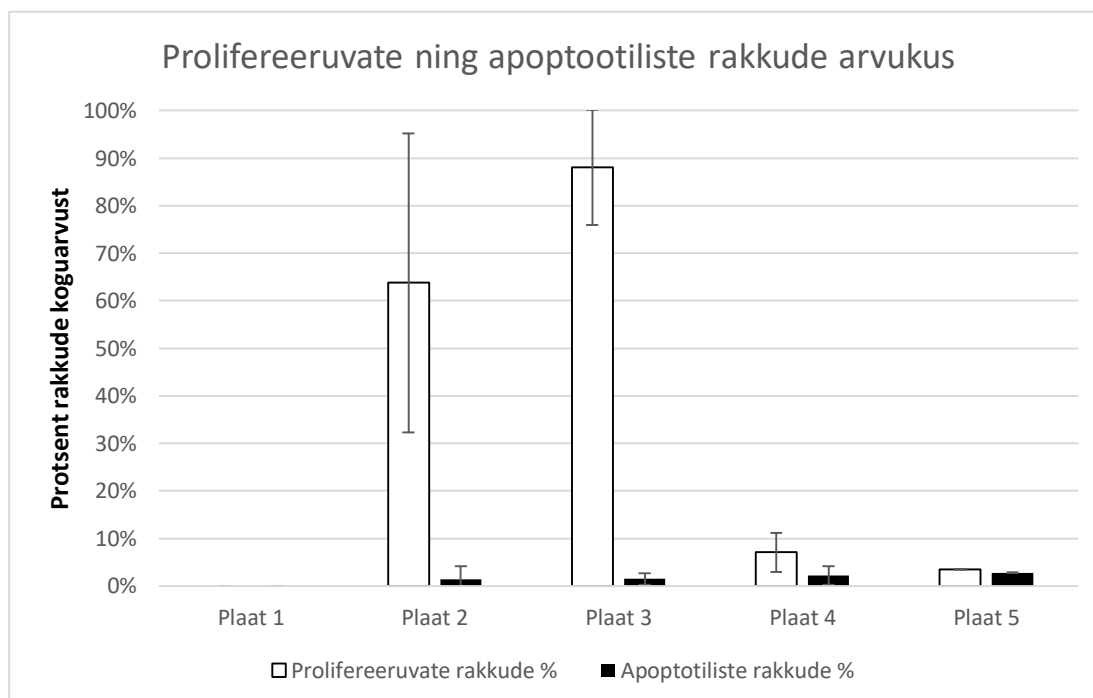
Sarnaselt ALD kaetud nanoosakeste mõju uurimisele teostati ALD kattega ränikiibi mõju tuvastamiseks immunofluorestsentsvärvimine. Protsess oli samade eesmärkidega, mis nanoosakeste puhul teostatud värvimine (rakkude arvukus, apoptoos ning proliferatsioon) (Joonis 10, Joonis 11, Joonis 12.).



Joonis 10. ALD meetodika erinevate nanokiledega kaetud räniplaatidel värvitud rakud. DAPI-ga värvitakse rakutuumi, falloidiiniga (Ph) tsütoskeleti, Ki-67-ga proliferereervaid rakutuumi ning TUNEL kit-iga (Tu) apoptootilisi rakke. Koondpildile on toodud eelneva nelja värvi koondpilt. Pildid on 10x suurendusega.



Joonis 11. Nanokilega kaetud räniplaatidel olevate rakkude arvukus. Pildid on tehtud 10x suurendusega ning loetletud on DAPI signaali alusel tuvastatud rakutuumasid.



Joonis 12. Prolifereeruvate ning apoptootiliste rakkude osakaal rakkude koguhulgast Ki-67 ning TUNEL värvimise alusel. Prolifereeruvate ning apoptootiliste rakkude protsent rakkude koguhulgast koos väljatoodud veapiiridega.

Kuigi joonisel olev falloidiini signaal on mõnevõrra nõrk, on siiski selgelt eristatav DAPI, Ki-67 ning TUNEL signaalid. Esineb selge erinevus plaatide 2 ja 3 ning teiste vahel. Nimelt esineb teistest tugevalt erinev Ki-67 signaal ehk võib täheldada rakkude prolifererumist, vastupidiselt teistele plaatidele. Seda kinnitab ka rakkude loetlemise alusel koostatud statistika. Kuigi standardhälve on suur erinevad plaatide 2 ja 3 väärtused tunduvalt teiste plaatide omast. Samuti ei kattu veapiirid. Nagu ka nanoosakeste värvimisel, ei tundu olevat olulist apoptoosi signaali.

2.4 Arutelu

Nanotehnoloogia kui kasvav teadusharu leiab meie igapäevaelus üha enam rakendust. Seoses organismide kokkupuutega võõraste ainetega on tekkinud vajadus uurida nende ainete võimalikke kahjulikke kõrvalmõjusid. Samuti on nanotehnoloogia materjalide võimalikud rakendused mitmekesistunud. Sellest tulenevalt on vajalik nanomaterjalide mõju täpne kirjeldamine nende kahjuliku toime vältimiseks ning võimalike omaduste optimaalseks ärakasutamiseks. Selleks uuriti käesoleva töö eksperimentaalses osas ALD meetodiga kaetud materjalide mõju inimese fibroblastide arvukusele, apoptoosile ja kasvule erinevate materjalide juuresolekul.

Esmalt uuriti titaanoksiididega kaetud raua nanopartiklite mõju. Nanoosakesed on sünteesitud TÜ Füüsika Instituudi üliõpilase Peep Uudekülli poolt. Nanoosakeste mõju uurimiseks võrreldi kaetud ja katmata raua nanopartiklitega kasvanud inimese fibroblastide arvukust nanoosakeste vabas keskkonnas kasvanud fibroblastide arvukusega. Teostati immunofluorestsentsmikroskoopia ning rakkude arvukuse mõõtmine ATP alusel. Analüüsides mikroskoopia ja mõõtmiste tulemusi on näha, et nii kaetud kui katmata partiklid omavad pärssivat mõju fibroblastide kasvule, küll aga ei oma statistiliselt olulist apoptootilist mõju. Selline efekt võib tuleneda rakkude membraani destabiliseerimisest. Sellist efekti on täheldatud fullereenide puhul. [58] Sel juhul on mõistetav ka vähene apoptoos. Esineb erinevusi kaetud ja katmata osakeste vahel kuid veapiiride kokkulangemise tõttu ei saa tuua välja selget erinevust. Kokkulangemine võib tuleneda nii katsete vigadest. Võimalik, et liialt väiksest valimist, kuid on tõenäolisemalt seotud osakeste väikesest tsütotoksilisest erinevusest, kusjuures kaetud osakesed näitavad trendi olla vähem kahjulikud. Effekt suureneb osakeste kontsentratsioonide suurenemisega. Märkimisväärne on konstantselt suurem rakkude arvukus titaanoksiid kattega

nanopartiklite puhul. (Joonis 6, Joonis 9.)

Sellest võib järeldada, et raua nanopartikli katmine titaanoksiidiga vähendab marginaalselt raua nanoosakese fibroblastide elutegevust pärssivat toimet, kusjuures toime on märgatavam suurtel osakeste kontsentratsioonidel.

Järgnevalt vaadeldi nanokilega kaetud räniplaatide mõju. Räniplaadid on valmistanud Tartu Ülikooli Füüsika Instituudi materjaliteaduse vanemteaduri Dr. Aile Tamme tööühm ning nende mõju uurimiseks teostati valdavalt samad katsed. Võrreldi erinevate katetega räniplaatide mõju rakkude kasvule ja apoptoosile. Selleks teostati immunofluorestsentsvärvimine ja loetleti kümnest asukohast rakke ning võeti aritmeetiline keskmine. Tulemustest on näha, et ka antud metalloksiidide nanokiled omavad tsütotoksilist efekti. See tuleneb tõenäoliselt ALD kihi omadustest, nagu nanopartiklite puhul. Samas on oluline erinevus katmata räni toksilisusega. See võib paremini illustreerida metalloksiid kihi omadusi alusmaterjalist, võrdlemisi, sõltumatult. Kõikidest räni katmise variantidest omavad titaan- ja tantaanoksiidide kombineeritud variandid enim prolifereruvaid rakke. Miks see nii on, on hetkel teadmata. Puudub piisav kirjandus antud metalloksiidide kombineeritud nanokilede kohta. Kusjuures ka suurte veapiiride korral on tulemus mitmekordne. See näib kinnitavat asjaolu, et kuigi individuaalsed materjalid võivad olla kahjulikud, nagu seda on titaanoksiidid, võib õige kombinatsiooni korral efekt olla drastiliset erinev.

See lubab oletada, et rakkude kasvu inhibeerib kõige vähem kombinatsioon titaanoksiidist ja tantaanoksiidist, kusjuures kombinatsioon titaan-titaan-titaan omab mitmekordselt väiksemat mõju rakkude proliferatsioonile. Õigete kombinatsioonidega on võimalik tsütotoksilisi efekte vähendada ja võibolla eemaldada. Seetõttu on oluline jätkata uuringuid edasiste ALD kombinatsioonidega ja leida täpsed mehhanismid, mis rakkude kasvu pidurdavad või apoptoosi esile kutsuvad.

KOKKUVÕTE

Nanomaterjalid omavad oma väikse suuruse, puhtuse ja eripinna tõttu makrotasemest drastiliset erinevaid omadusi. Need võivad olla kasulikud omadused materjalide tugevdamiseks või elektrijuhtivuse andmiseks kuid võivad samas omada ka kahjulikke efekte nagu seondumine raskemetallidega. Kuna nanomaterjalide mitmekesisus on suur, pole paljude materjalide ja materjalide kombinatsioonide mõju veel teada. Antud töö eesmärk oli kirjeldada erinevate metalloksiididega kaetud raua nanopartiklite ja räniplaatide mõju inimese fibroblastidele.

Esmalt leiti katsete läbiviimiseks ja pildistamiseks sobiv rakkude hulk. Selleks vaadeldi erinevate rakuühikute reaktsioone DMSO-le ja NSC156529-le ning sellest saadud piltide kvaliteeti. Katsete läbiviimiseks valiti rakkude kontsentratsiooniks 3000 rakku kannu kohta. Järgnesid katsed raua nanopartiklitega. Võrreldi rakke, mis kasvasid titaanoksiidiga kaetud ning katmata nanopartiklitega ning kontrollgrupi rakke. Rakud kasvasid nanoosakestega kontsentratsioonidel 0,125-2 mg/l. Teostati raku arvukuse mõõtmist *Luminescent Cell Viability Assay* kitiga. Katset teostati kolmes korduses ja saadud tulemustest koostati statistika. Teostatud immunofluorestsentsvärvimine tõi esile olulise raku apoptoosi puudumise. Tulemustest võib tänu veapiiride kattumisele järeldada, et pole olulist vahet raua kaetud ja katmata nanopartiklite vahel antud kontsentratsioonidel. Küll aga suureneb erinevus nanoosakeste suuremate kontsentratsioonide korral, ning efekt seisneb valdavalt kasvu pidurdamises, mitte apoptoosis.

Seejärel teostati räniplaatidega analoogsed katsed. Räniplaatide variandid olid kaetud erinevate titaani ja tantaani oksiidide kombinatsioonidega ning ka rubiidiumi oksiidiga. Teostati immunofluorestsentsvärvimine ning loetleti prolifereruvaid, mitteprolifereruvaid ning apoptootilisi rakke. Tulemustest võib järeldada et sarnaselt nanopartiklitele on ALD titaanoksiid nanokiled rakkude kasvu pärssiva toimega. Erinevus esines kombineeritud titaan- ja tantaanokssiidide mõjus, kusjuures tantaanoksiid vahekihiga nanokile mõjutab rakke kõige vähem.

Katsete tulemusena võib järeldada, et kuigi ainete ALD kihtidega katmine ei eemalda ainete potentsiaalseid tsütotoksilisi omadusi, võivad õige koostisega nanokiled efekti oluliselt vähendada.

The effect of ALD-covered iron nanoparticles and silicium discs on human fibroblasts

Rait Vetik

SUMMARY

Due to their small size, purity and high surface area, nano materials have drastically different characteristics than macro level particles. These characteristics could be useful for reinforcing materials or for electrical conductivity but they might also have negative effects. For example, they can bind with heavy metals. We do not know yet the effects of all the combinations of materials because the diversity of nano materials is wide. The aim of this thesis was to describe the effects of iron nanoparticles and silicium discs covered in different metal oxides and their effect on human fibroblasts.

First, the suitable amount of cells for conducting these experiments was identified. For that, reactions with DMSO and NSC156529 with different cells amounts were observed and the quality of pictures was evaluated. The concentration of 3000 cells per well was chosen for the experiments. Cells were grown in wells containing both titanium oxide covered and uncovered nanoparticles. These cells were compared with a control group. The cells grew with nanoparticles in concentrations of 0,125-2 mg/l. The number of cells was measured with the *Luminescent Cell Viability* kit. The experiment was repeated three times and statistics were compiled from those results. Immunofluorescence staining showed that there was no large increase in cell apoptosis. Because the margins of errors overlapped, it can be said that there is no statistical difference between covered and uncovered iron nanoparticles at these concentration. But, the difference at higher concentrations seems to be greater. The effect seems to be slowed growth rather than apoptosis.

Then, analogous experiments with silicium discs were made. The silicium discs were covered with different titanium and tantalum oxide combinations or with rubidium oxide. An immunofluorescence staining was conducted and proliferating, non-proliferating and apoptotic cells were counted. Based on the results, it can be said that ALD titanium oxide nano layers possess a cell growth inhibiting effect. The difference was in the combined titanium and tantalum oxide layers, which showed a marked decrease in cell growth inhibition. In the conducted tests a layered titanium tantalum nano sheet with a tantalum oxide middle layer was shown to have the smallest effect on cell growth.

Based on these results, it can be said that although covering matter with ALD layers does not

remove the potential cytotoxic properties entirely, the right combination of materials may lessen the effect significantly.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada enda juhendajat Mariliis Klaasi tema vastutulelikkuse ja toe eest töö koostamisel, oma teist juhendajat Viljar Jaksi võimaluste eest ning Aile Tamme käesoleva töö teema eest. Tänan Annika Treid, kes jagas teadmisi ja andis edasi praktilisi oskusi laboris ning koekultuuris. Viimaks soovin tänada Anett-Hildegard Laarmanni toe ja motivatsiooni eest kogu protsessi vältel.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of nanotechnology. *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng.* Tokyo. Part II. Japan Society of Precision Engineering, lk. 18-23
- [2] Binnig, G. ja Rohrer, H. (1986). Scanning tunneling microscopy. *IBM Journal of Research and Development*. 30 (4): 355–69
- [4] Roco, C. M. (2011). The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *Journal of Nanoparticle Research*. 13 (2):427
- [6] Chang, Y-L ja Lu, Z-H. (2013). White Organic Light-Emitting Diodes for Solid-State Lighting. *Journal of Display Technology*. (99):1
- [7] Pappalardo, J. (2004). US Navy finding new applications for advances in nanotechnology. *National Defense Magazine*.
- [11] Buzea, C., Blandino, I. I. P., Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2 (4):172
- [12] Khan, F. (2012). Biotechnology Fundamentals. *Boca Raton, FL: CRC Press*
- [13] Narayan, R. J. *et al.* (2004). Nanostructured Ceramics in Medical Devices: Applications and Prospects. *JOM*. 56 (10): 38–43
- [18] Jayadevan, K. P., Tseng, T. Y. (2004). Oxide Nanoparticles in Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. *Vol 8. American Scientific Publishers*. pp. 333-376
- [19] Pinna, N. ja Niederberger. (2009). Metal Oxide Nanoparticles in Organic Solvents. *B. Derby, Ed., Springer London*.
- [20] Jayadevan, K. P. ja Tseng, T. Y. (2004). Oxide Nanoparticles in Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. *American Scientific Publishers*. (8): 333-376

- [21] Miikkulainen, V. *et al.* (2013). Crystallinity of inorganic films grown by atomic layer deposition: Overview and general trends. *Journal of Applied Physics*. 113 (2):021301
- [23] Malygin, A. *et al.* (2015). From V. B. Aleskovskii's "Framework" Hypothesis to the Method of Molecular Layering/Atomic Layer Deposition. *Chem. Vap. Deposition*. 21: 216–240
- [24] Puurunen, R. L. (2014). A Short History of Atomic Layer Deposition: Tuomo Suntola's Atomic Layer Epitaxy. *Chem. Vap. Deposition*. 20: 332–344
- [25] Puurunen, R. L. (2005). Surface chemistry of atomic layer deposition: A case study for the trimethylaluminum/ water process. *Journal of Applied Physics*. 97 (12): 121301
- [27] George, S. M. (2009). Atomic Layer Deposition: An Overview. *Chemical Reviews*. 110: (1), 111-131
- [28] Walsh, R. B., Nelson, A., Skinner, W. M., Parsons, D., Craig, V. S. J. (2012). Direct Measurement of van der Waals and Diffuse Double-Layer Forces between Titanium Dioxide Surfaces Produced by Atomic Layer Deposition. 1. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2. 116: (14), 7838-7847
- [29] Johnson, R. W., Hultqvist, A., Bent, S. F. (2014). A brief review of atomic layer deposition: from fundamentals to applications. *Materials Today*. 17(5):236–246
- [31] Oberdörster, G, Oberdörster, E., Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect*. 113(7): 823–839
- [32] Nel, A. *et al.* (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*. 311(5761): 622–7
- [33] Hewakuruppu, Y. L.; Dombrovsky, L. A.; Chen, C.; Timchenko, V.; Jiang, X.; Baek, S.; Taylor, R. A. (2013). Plasmonic "pump–probe" method to study semi-transparent nanofluids. *Applied Optics*. 52(24): 6041–6050

- [34] Shin, S. W., Song, I. H., Um, S. U. (2015). Role of Physicochemical Properties in Nanoparticles. *Nanomaterials* 10(5):1351-1365
- [35] Kashiwada, S. (2006). Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Health Perspect.* 114 (11): 1697–702
- [36] Oberdörster, E. (2004). Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environ Health Perspect.* 112(10): 1058–1062
- [38] Elliott, K. C. (2007). Varieties of exploratory experimentation in nanotoxicology. *Hist Philos Life Sci.* 29(3):313-36
- [40] Ivarsson, M. *et al.* (1998). Type I collagen synthesis in cultured human fibroblasts: regulation by cell spreading, platelet-derived growth factor and interactions with collagen fibers. *Matrix Biol.* 16(7):409-25
- [42] Jui, D., Bayless, K. (2014). Vimentin as an Integral Regulator of Cell Adhesion and Endothelial Sprouting. *Microcirculation* 21 (4): 333–344
- [43] Kasper, M., Stosiek, P. (1990). The expression of vimentin in epithelial cells from human nasal mucosa. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 248 (1): 53-56
- [44] Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, Y. J., Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 139 (5): 871–890
- [45] Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y. T., Kaibuchi, K., Takahashi, Y. (2004). Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev Cell.* 7 (3): 425–38.
- [46] Jordan, A. *et al.* (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 74 (4): 679 – 691
- [47] Yang, J. *et al.* (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell.* 14 (6): 818 – 829

- [48] Ravikanth, M., Soujanya, P., Manjunath, K., Saraswathi, T. R., Ramachandran, C. R. (2011). Heterogeneity of fibroblasts. *J Oral Maxillofac Pathol.* 15(2): 247–250
- [49] Munaut, C., Noël, A., Sobel, M., Foidart, J. M. (1991). Expression of laminin by human fibroblasts, HT1080 fibrosarcoma cells and MCF-7 breast adenocarcinoma cells. Lack of regulation by the cell density and extracellular matrix. *Cell Biol Int Rep.* 15(6):499-509
- [50] da Rocha-Azevedo, B., Ho, C-H., Grinnell, F. (2012). Fibroblast Cluster Formation on 3D Collagen Matrices Requires Cell Contraction-Dependent Fibronectin Matrix Organization. *Exp Cell Res.* 319(4): 546–555
- [51] Datta, A., Alexander, R., Sulikowski, M. G., Nicholson, A. G., Maher, T. M., Scotton, C. J., Chambers, R. C. (2013). Evidence for a Functional Thymic Stromal Lymphopoietin Signaling Axis in Fibrotic Lung Disease. *J Immunol.* 191(9): 4867-4879
- [52] Goldberg, B., Epstein jr., E. H., Sherr, C. J. (1972). Precursors of Collagen Secreted by Cultured Human Fibroblasts (isotopic labeling/chromatography/gel electrophoresis). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69(12):3655-3659
- [54] Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care.* 22(8):407-8, 410-12
- [55] Wu, Y. *et al.* (2013). Connective Tissue Fibroblast Properties Are Position-Dependent during Mouse Digit Tip Regeneration. *PLoS ONE* 8(1): 54764
- [56] Niederberger, M., Garnweitner, G. (2006). Organic reaction pathways in the nonaqueous synthesis of metal oxide nanoparticles. *Chem. Eur. J.* 12. 7282–7302
- [57] Uudeküll, P. (2013). Metalloksiidsete nanoosakeste süntees ja karakteriseerimine. Tartu Ülikooli Füüsika Instituut. Lk 8, 13-14
- [58] Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 4(1):26-49

[59] Mäemets-Allas, K., Viil,J., Jaks, V. (2015). A Novel Inhibitor of AKT1-PDPK1 Interaction Efficiently Suppresses the Activity of AKT Pathway and Restricts Tumor Growth In Vivo. *Mol Cancer Ther.* 14(11):2486-96

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

[3] "The Nobel Prize in Physics 1986". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/> [Kasutatud 16. mai, 2016]

[5] <http://nanomaterials.conferenceseries.com/2016/> [Kasutatud 16. mai, 2016]

[8] "The United States National Nanotechnology Initiative" 2013. <http://www.nano.gov/nanotech-101> [Kasutatud 16. mai, 2016]

[9] Nanotechnology: An Overview Based On Indicators And Statistics. <http://www.oecd.org/sti/inno/43179651.pdf>. [Kasutatud 7. mai, 2017]

[10] <http://www.nano.gov/nanotech-101> [Kasutatud 17. mai, 2016]

[14] Mechanical Milling: a Top Down Approach for the Synthesis of Nanomaterials and Nanocomposites. <http://article.sapub.org/10.5923.j.nn.20120203.01.html> [Kasutatud 17. mai, 2016].

[15] <http://www.thinkyusa.com/application/pulverization/pharmaceutical-materials/nifedipine.html> [Kasutatud 14. mai, 2016]

[16] "Nanotechnology Timeline" 2013. <http://www.nano.gov/timeline>. [Kasutatud 27. oktoober, 2013]

[17] <http://www.freepatentsonline.com/EP2590765.html> [Kasutatud 14. mai, 2016]

[26] Atomic layer deposition. <http://archive.cnx.org/contents/ae29812b-5c71-4740-ac36-6809c5282026@2/atomic-layer-deposition> [Kasutatud 16. mai, 2016]

[30] <https://www.oxford-instruments.com/products/etching-deposition-and-growth/plasma-etch-deposition/atomic-layer-deposition> [Kasutatud 17. mai, 2017]

[37] Lippmaa E, Kahru A. Nanode ilu ja valu. Horisont, 3/2010.
<http://www.horisont.ee/node/1392> [Kasutatud 17. mai, 2016]

[39] Nanotechnologies: 6. What are potential harmful effects of nanoparticles?
http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/nanotechnologies/1-2/6-health-effects-nanoparticles.htm [Kasutatud 14. mai, 2016]

[41] <https://ghr.nlm.nih.gov/> [Kasutatud 13. märts, 2017]

[53] „fibroblast.“ 2016. Encyclopædia Britannica Online.
<http://www.britannica.com/science/fibroblast> [Kasutatud 17. mai, 2016]

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rait Vetik (02.02.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „ALD kaetud nanoosakeste ning räniplaatide mõju inimese fibroblastidele“, mille juhendajad on Mariliis Klaas ja Viljar Jaks

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017